

THESIS

- München - 1963

Beeinflussung des Haptoglobinspiegels bei Gesunden
und durch Operationsstreß belasteten Versuchspersonen
durch Nebennierenrindensteroidmedikation

Margit/Staiger

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

BEEINFLUSSUNG DES HAPTOGLOBINSPIEGELS
BEI GESUNDEN UND DURCH OPERATIONSSTRESS
BELASTETEN VERSUCHSPERSONEN
DURCH NEBENNIERENRINDENSTEROIDMEDIKATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Margit Staiger
aus
Pforzheim

1963

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. SEITZ

Dekan: Professor Dr. A. HERRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Mai 1963

IN DANKBARKEIT
MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Problematik	1
Eigene Versuche	9
A. Methodiken	9
a. Methodik der qualitativen Haptoglobinbestimmung	9
Reagentien und Lösungen	
Apparative Ausrüstung	
Herstellung des Stärkegels	
Hämolysieren der Serumproben	
Durchführung der Elektrophorese	
Entnehmen, Schneiden und Färben der Gelstreifen	
Auswertung	
b. Methodik der quantitativen Haptoglobinbestimmung	12
Reagentien und Lösungen	
Apparative Ausrüstung	
Durchführung der Bestimmung	
Auswertung	
B. Angewandte Versuchssubstanz	15
C. Versuchsreihen	16
D. Versuchsergebnisse	17
Diskussion	23
Zusammenfassung	26
Literaturverzeichnis	
Lebenslauf	

PROBLEMATIK

Das Haptoglobin wurde von Jayle und Polonovski (1) entdeckt anläßlich der Beobachtung, daß man bei Zugabe von Hämoglobin zu Serum eine höhere Peroxydaseaktivität erhält, als das nach der reinen Hämoglobinkonzentration zu erwarten wäre. Jayle und Polonovski nahmen ein Serumprotein als Ursache dieser erhöhten Peroxydaseaktivität an und nannten es "Haptoglobin". Wie genauere Untersuchungen ergaben, bildet das Haptoglobin einen sehr stabilen Komplex mit dem Hb und reagiert stöchiometrisch mit dem Hb.

Die Haptoglobine wandern in der Papierelektrophorese mit den α_2 -Globulinen (2), und ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4,1 (3). Zunächst traf man eine Unterteilung in 2 Haptoglobintypen, die durch unterschiedliche Löslichkeit in Ammonsulfat charakterisiert sind (4).

Durch Stärkegelelektrophorese unterschied Smithies (5) dann 3 Haptoglobintypen, die durch allele Genpaare determiniert sind. Die Haptoglobintypen 1-1 und 2-2 sind homozygot, 2-1 ist heterozygot. Die Annahme, daß die verschiedenen Haptoglobintypen Ausdruck dreier Genotypen sind, geht auf eine Theorie von Allison (6) zurück. Die einzelnen Haptoglobinmoleküle können sich mit Bindegliedern aneinander ketten.

Das durch das Gen Hp^1 bestimmte Protein Hp^1 hat nur ein Bindeglied, und die Hp -Moleküle des Phänotypes Hp^1 können keine Polymere bilden. Man findet in den Seren nur Monomere. Dagegen hat das Protein Hp^2 ein ergänzendes Bindeglied, und der durch die Hp^2/Hp^2 -Homozygoten charakterisierte Typ Hp^2 kann Polymere bilden. Diese trennen sich in der Stärkegelelektrophorese in verschiedene Banden auf. Der Typ Hp^2 weist gemischte Polymere auf, von denen jedes jedoch nur einen Hp^1 -Bestandteil enthalten kann.

Mit der Stärkegelelektrophorese kann man die verschiedenen Haptoglobintypen qualitativ nachweisen. Man verwendet ein basisch gepuffertes Gel, das aus partiell hydrolysierter Kartoffelstärke hergestellt wird und läßt das Serumweiß unter Gleichstromspannung darin wandern. Dabei wird die Wanderungsgeschwindigkeit von Ladung und Größe der Moleküle bestimmt. Da das Stärkegel Siebwirkung besitzt, gelingt eine Trennung der Serumproteine in 18 und mehr Fraktionen.

Die Reihenfolge der Proteine in der Stärkegelelektrophorese (Kathode-Anode)

ist nach Smithies (32) γ -Globulin, s-(slow)- α_2 -Globulin, Haptoglobinsystem, β -Globulin, f-(fast)- α_2 -Globulin, mehrere sogenannte Postalbumine, Albumin, zwei Präalbumine. Bei der Papierelektrophorese wandert das Haptoglobin in α_2 -Globulinbereich und der Haptoglobin-Hämoglobinkomplex zwischen α_2 - und β -Globulinen. Bei der von uns angewandten Benzidinfärbung wurde nur das nicht gebundene Hämoglobin und der Hämoglobin-Haptoglobinkomplex sichtbar gemacht.

Chemisch handelt es sich bei den Haptoglobinen um Glykoproteine, deren Kohlenhydratgehalt etwa 21% betragen soll (Jayle und Boussier 7). Daneben wurden bei der chemischen Auftrennung Stickstoff, Eiweiß, Neuraminsäuren und Schwefel nachgewiesen. Die Bindung zwischen Haptoglobin und Hämoglobin ist eine sehr starke, und der Komplex liegt praktisch undissoziiert vor. Wenn man das Serum mit Formaldehyd behandelt, wird die Komplexbildung nur unwesentlich gehemmt, dagegen kann sich kein Komplex mehr bilden, wenn man das Hämoglobin mit Formaldehyd behandelt (8). Auch läßt sich die Komplexbildung durch elektrisch positive, negative und neutrale polymere Substanzen stören, sodaß man annehmen muß, daß elektrostatische Kräfte bei der Komplexbildung unterstützend wirken, ohne daß damit die starke Bindung zwischen Haptoglobin und Hämoglobin endgültig geklärt wäre (34)

Haptoglobin verfügt über keine freien SH-Gruppen wie freies Hb (17). So spielen auch S-S-Bindungen keine Rolle bei der Komplexbildung (8). Nach Ansicht von van Royen (9) sind es freie Aminogruppen des Hämoglobin und freie Carboxylgruppen des Haptoglobin, die an der Bildung des Komplexes beteiligt sind. COHb, MetHb oder CNHb gehen ebenfalls die Bindung mit Haptoglobin ein, nicht nur oxydiertes oder reduziertes Hb. Außerdem ist es auch gleichgültig, ob es sich um menschliches Hämoglobin oder um solches von Pferd, Rind, Kaninchen und anderen Tieren handelt, da das Haptoglobin zu all diesen Hämoglobinen die selbe Affinität hat.

Experimente mit intravenösen Hämoglobininjektionen zeigten, daß das Hb sofort an alles freie Haptoglobin des Plasmas gebunden wird. Dabei reichen 3,5 g Hb aus, das freie zirkulierende Haptoglobin zu binden. Die Haptoglobinkonzentration im Blut erreicht nach 5 - 7 Tagen ihre Ausgangskonzentration wieder, da der durch die Hämoglobininjektion gebildete Komplex mit einer konstanten Quote von 0,3 - 0,8 g/Stunde aus dem Blut ausgeschieden wird (Chaplin zit. 17). Daraus kann man folgern, daß an

Hb gebundenes Haptoglobin nicht zur erneuten Bindung von Hämoglobin fähig ist, sondern aus dem Blut verschwindet.

Über den Ursprung des Haptoglobinmoleküles im Organismus sowie über seinen Verbleib ist nichts Sicheres bekannt. Jayle und Boussier (12, 13) stellten eine Hypothese auf, nach der Fibrozyten das Haptoglobin aufbauen sollen. Sie hatten nämlich festgestellt, daß anscheinend Beziehungen zwischen Haptoglobin, Fibrinogen, Orosomucoid und dem Aufbau und Umsatz von Polysacchariden des kollagenen Bindegewebes bestehen. Das von den Fibrozyten aufgebaute Haptoglobin soll teilweise in die Grundsubstanz des kollagenen Bindegewebes eingelagert werden und unter Depolymerisation des kollagenen Bindegewebes durch Hyaluronidasen wieder frei werden. Auf dem Blutwege soll sowohl das im Überschuß von den Fibrozyten produzierte Haptoglobin, wie das aus dem Bindegewebe freigesetzte in die Leber wandern und dort in zwei Teile aufgespalten werden. Dabei soll ein kohlehydratärmerer Teil zu Fibrinogen polymerisiert werden und ein kohlehydratreicherer das Orosomucoid darstellen.

Doch hat sich gezeigt, daß die Beziehungen zwischen Haptoglobingehalt und Orosomucoid nicht ganz eindeutig sind (14) und daß außerdem die nach dieser Hypothese nötige Übereinstimmung zwischen Haptoglobin- und Fibrinogenspiegel ebenfalls nicht sicher ist. Untersuchungen mit direkter Fibrinogenspiegelbestimmung, Bestimmung der Höhe des Haptoglobinspiegels und der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ergaben keine eindeutige Abhängigkeit der drei Werte voneinander (12, 16, 13).

Sonnet ging in seiner Hypothese über den Ursprung der Haptoglobine von der Feststellung aus, daß Neuraminsäure und Fucose, die Bestandteil aller Glucoproteide sind, in der Leber nicht synthetisiert werden können. Die Proteinkomponente des α_2 -Globulins soll aber in der Leber gebildet werden, und so kam Sonnet zu der Annahme, daß die Seromucoiden aus zwei verschiedenen Komponenten entstehen, einer in der Leber gebildeten Proteinkomponente und einer im kollagenen Bindegewebe entstehenden Kohlenhydratkomponente.

Kluthe (19) und Allison (20) glauben nach ihren neueren Untersuchungen an eine Haptoglobinsynthese in der Leber. Die tägliche Synthese soll dabei das 2- bis 3fache der zur Bindung des im Plasma vorhandenen Hämoglobins benötigten Menge betragen. Daß das Haptoglobin in der Leber gebildet wird, nehmen neuerdings auch Jayle und Moretti (16) an, sehen

aber dennoch eventuelle Zusammenhänge zwischen Polymerisationsgrad der Mucopolysaccharide der Grundsubstanz und dem Haptoglobinspiegel.

Robert und Mitarbeiter (21) zeigten, daß eine Steigerung des Haptoglobinspiegels beim Kaninchen zu erreichen ist, wenn man in hohen Dosen Hyaluronidase i.v. injiziert. Dieselbe erhöhende Wirkung auf den Haptoglobinspiegel erreicht man auch durch andere tryptische Fermente, z.B. Papain, das Chondroitinsulfat abbaut. Es muß nur das entsprechende Ferment ins Bindegewebe gebracht werden. Mathies, Schattenkirchner und Liebrich (22) zeigten, daß durch i.m. Injektion von Hyaluronidase beim Menschen der Bluthaptoglobinspiegel signifikant ansteigt. Dagegen sind i.v. Injektionen in für den Menschen erträglichen Dosen wirkungslos, da Hyaluronidase durch Inhibitoren unwirksam wird.

Der Haptoglobinspiegel des gesunden Menschen ist sehr konstant, jedoch sind Unterschiede zwischen den einzelnen Haptoglobintypen feststellbar.

Nach Jayle und Mitarbeitern (13) liegen die Normalwerte etwa bei 74 ± 31 mg%, nach Allison und Mitarbeitern (23) bei 130 ± 26 mg%. Frauen sollen nach Nyman (17) mit 90 ± 30 mg% niedrigere Normalwerte als Männer mit 113 ± 43 mg% haben. Untersuchungen von Schumacher und Schlumberger (24) ergaben für 22 Frauen einen Durchschnittswert von 117 ± 37 mg%.

Bei Frauen ist der Haptoglobinspiegel anscheinend cyclusabhängig, und so ist in der Follikelhormonphase die Hämoglobinbindungskapazität vermindert, bei der Menstruation erhöht (17). Androgene sollen den Haptoglobinspiegel erhöhen, Oestrogene ihn senken (15). Borglin und Nyman (26) untersuchten bei gesunden Frauen nach Verabreichung von Diäthylstilöestrol und Äthyniloestradiol den Haptoglobinspiegel und stellten fest, daß er ziemlich stark gesenkt war. Dagegen steigt der Haptoglobinspiegel bei zusätzlicher Gabe von 17α -methyl-19-nortestosteron sehr schnell wieder an.

Wie Borglin und Nyman (26) zeigten, kommt die Wirkung der Oestrogenverabfolgung weder durch Blutverdünnung noch durch Leberzellschaden zustande. Vielleicht ist ein erhöhter Erythrozytenabbau die Ursache. Studnitz und Nyman (27) fanden nach Androgengaben einen Anstieg des Haptoglobins. Zwischen der Höhe der α_2 -Globuline und dem Haptoglobin stellte Nyman (17) eine Beziehung fest. Etwa 21,1 - 24,2 % beträgt der normale Anteil des Haptoglobins am α_2 -Globulin.

Nach Jayle und Boussier (13) müßten die Glucocorticoide einen hemmenden Einfluß auf die Haptoglobinsynthese haben. Dabei gehen die Autoren aber von der oben beschriebenen Hypothese aus, daß die Haptoglobine von den Fibrozyten gebildet werden, bzw. durch Depolymerisation aus dem kollagenen Bindegewebe entstehen.

Tatsächlich ist der Haptoglobinspiegel ja bei allen Kollagenkrankheiten erhöht, außerdem bei Erkrankungen die mit Gewebszerstörung einhergehen, wie Tuberkulose, Herzinfarkt, Carcinom. Aber auch schwere Operationen sollen den Haptoglobinspiegel erhöhen (13). Nach Schumacher und Schlumberger (24) beeinflußt die Größe einer traumatischen Gewebeschädigung entscheidend das Ausmaß der einsetzenden Haptoglobininvermehrung, und der dabei beobachtete Anstieg der elektrophoretischen α_2 -Globulinfraction soll weitgehend der Haptoglobininvermehrung zuzuschreiben sein.

Selye (zit. 13) stellte eine Theorie über die endokrinologische Kontrolle der Metabolismen des Bindegewebes auf und stellte fest, daß das Wachstumshormon die Reaktionsprozesse antreibt, d.h. die Vermehrung der freien Glycoproteine im Blut und des normalen und pathologischen Bindegewebes bewirkt. Die Vermehrung der Glycoproteine im Blut zieht aber auch eine Vermehrung der Haptoglobine nach sich. Dies geschieht aber anscheinend nicht direkt durch das Wachstumshormon, denn Selye stellte fest, daß bei Tieren, denen die Nebennierenrinde entfernt wurde, diese Reaktion nicht auftritt. Cortison und ACTH dagegen wirken hindernd auf die Bildung von Granulationsgewebe und Bindegewebe, da Cortison die Synthese der Chondroitinschwefelsäure hemmt.

Bei all diesen Feststellungen wird aber doch letzten Endes in Bezug auf die Haptoglobine von der Theorie ausgegangen, daß die Glycoproteine durch Depolymerisation der Grundsubstanz des kollagenen Bindegewebes in den Kreislauf gelangen, und daß dies die Gleichzeitigkeit und Proportionalität zwischen den bindegewebigen und humoralen Veränderungen erklärt.

Diese Hypothese soll nach Jayle und Boussier (13) auch das Vermögen des Cortisons erklären, die plasmatischen Glycoproteine und damit auch die Haptoglobine zu vermindern. Dies ist bei Kranken mit Kollagenkrankheiten auch sicher der Fall, ob allerdings über Verminderung des Granulationsgewebes oder durch direkte Beeinflussung der Haptoglobine, bleibt die Frage. Dagegen stellten Weimer und Knobloch (zit. 13) keine Ver-

minderung der Mucopolysaccharide Chondroitinschwefelsäure und Hyaluronsäure im Plasma bei Gaben von Cortison an gesunde Tiere fest.

Die quantitativen Bestimmungsmethoden des Haptoglobins beruhen auf der Fähigkeit des Haptoglobins, stöchiometrisch mit Hämoglobin zu reagieren und dabei die Peroxydaseaktivität des Hämoglobin zu steigern.

Jayle (28, 29, 30) hat eine Aktivierungsmethode angegeben, bei der das in einem Serum enthaltene Haptoglobin mit Pferdehämoglobin abgesättigt wird, wodurch dessen Peroxydaseaktivität sehr gesteigert wird. Es wird nun Äthylhydroperoxyd zugegeben, das durch die Peroxydase in Sauerstoff und Äthylalkohol gespalten wird. Gibt man nun Jodlösung zu, so entsteht aus ihr durch Oxydation durch den Sauerstoff freies Jod. Stärkelösung dient als Indikator bei der nun folgenden Titration des elementaren Jodes gegen Natriumthiosulfat. Die frei gewordene Jodmenge ist direkt proportional der Menge des die Reaktion katalysierenden Komplexes. Damit kann man die zur Titration benötigte Menge Natriumthiosulfat als Maß für den Haptoglobingehalt des untersuchten Serums nehmen.

Man hat nun einige Maßeinheiten geschaffen. Als Titrationswert bezeichnet man die Menge Natriumthiosulfat, die bei der Titration verbraucht wird, und von der man die zur Titration eines Reagensgemisches ohne Serum verbrauchte Menge abgezogen hat. Dann kennt man noch die Einheit des Haptoglobindex. Darunter versteht man die Haptoglobinkonzentration in einem Serum, die ein gleiches Volumen einer Hämoglobinlösung sättigt, die 1/80000 molar bezüglich des Hämoglobingesamt-moleküles ist (17). Haptoglobin hat ein Molekulargewicht von 85 000. Dimere und Polymere des Haptoglobins binden jeweils zwei bzw. mehrere Moleküle Hämoglobin. Da der Hämoglobin-Haptoglobinkomplex äquimolare Mengen Hämoglobin und Haptoglobin enthält, bindet eine 1/85000 molare Haptoglobininlösung das Hämoglobin der gleichen Menge einer 1/80000 molaren Hämoglobinlösung.

Eine Haptoglobindexeinheit entspricht demnach:

$$\frac{85\,000}{80\,000} \text{ g/l} = 1,0625 \text{ g/l} = 106,25 \text{ mg/l}$$

Bei der von uns durchgeführten Aktivierungsmethode geht es um die Katalysierung der folgenden chemischen Reaktion:



Eine größere Menge des Komplexes würde in der selben Zeit eine größere Menge elementares Jod freisetzen, und es ist also die Menge des elementaren Jodes zur Menge des Hämoglobin-Haptoglobinkomplexes und somit auch zur Haptoglobinkonzentration des untersuchten Serums direkt proportional. Der Haptoglobin-Hämoglobinkomplex mit seiner Peroxydaseeigenschaft wirkt bei der obigen Reaktion also als Katalysator. Voraussetzung ist natürlich, daß die Untersuchung unter genau gleichen Bedingungen für Zeit, Temperatur und pH abläuft.

Man kann nun aus der Menge des freigewordenen Jodes die Haptoglobinkonzentration errechnen, wenn man folgendes beachtet: 0,05 ml Serum, in dem eine Haptoglobinkonzentration von 106,25 mg/100 ml vorhanden ist, und das damit den Haptoglobinindex 1 hat, ist in der Lage, bei pH 4,4 und 32°C in 5 Minuten 1 ml 0,01 normales Jod freizusetzen, vorausgesetzt, sein Haptoglobin ist mit Hämoglobin gesättigt. Es kann also der Haptoglobinindex auch durch die Menge 0,01 n Jodlösung in ml definiert werden, die durch Einwirkung von 0,05 ml Serum in 5 Minuten frei wird, und ist aus dem Titrationswert zu errechnen.

Die absolute Haptoglobinmenge kann man unter Berücksichtigung der Molekulargewichte des Haptoglobins (85000) und des Hämoglobins (80000) nach der Formel:

$$\frac{\text{Hp-Index} \times 85000 \times 100}{80000} = \text{Hp-Index} \times 106,25 = \text{Hp mg/100 ml Serum}$$

errechnen.

Außer dieser Methode ist von Jayle noch eine Sättigungsmethode beschrieben worden (30). Dabei wird die Hämoglobinbindungskapazität des Serums festgestellt. Diese ist umgekehrt proportional der geringsten Menge Serum, mit der eine maximale Fermentreaktion erzielt wird, dividiert durch die verwendete Hb-Menge.

$$\frac{\text{Hb mg} \times 100}{\text{Serum ml}} = \text{Hämoglobinbindungskapazität/100 ml.}$$

Also ist die Hämoglobinbindungskapazität definiert durch die Menge Hämoglobin in mg, die durch das in 100 ml Serum enthaltene Haptoglobin gebunden werden kann. Sie läßt sich aus dem Titrationswert nach folgender Formel errechnen:

$$\text{Titrationwert} \times 2,07 \times 100 = \text{Hb-Bindungskapazität/100 ml.}$$

Dabei liegt die von Jayle angewandte Methode zugrunde, nach der 0,02 ml Serum 5 Minuten lang zur Einwirkung kommen (30). Bei allen quantitativen Haptoglobulinbestimmungen muß man verschiedene Fehlermöglichkeiten beachten.

Nach Nyman (17) kann es ja möglich sein, daß im Serum Substanzen vorhanden sind, die auf irgend eine Weise die Bildung des Hämoglobin-Haptoglobinkomplexes behindern oder auf die Peroxydaseaktivität eine Wirkung haben. Nyman (17) stellte fest, daß es noch keine näheren Untersuchungen zu dieser Frage gibt. Es ist aber vom Heparin bekannt, daß es die Komplexbildung und Fermentaktivität des Komplexes behindert (17, 31), und daß Heparinkonzentrationen über 0,4 ml/ml Serum den Komplex sogar teilweise spalten sollen.

Eine weitere Fehlerquelle könnte darin bestehen, daß die Seren durch hämolytische Verunreinigung mehr freies Hämoglobin enthalten.

Es wäre auch noch die Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, daß außer dem Haptoglobulin noch andere Komponenten im Serum enthalten sein könnten, die die Peroxydaseaktivität beeinflussen. Nyman hat darüber Untersuchungen durchgeführt (17), mißt allerdings dieser Möglichkeit keine große Bedeutung zu. Es sind wohl wahrscheinlich solche Substanzen anzunehmen, aber ihre Auswirkung auf die Peroxydaseaktivität ist als sehr gering zu bezeichnen.

Es ist auch noch in Betracht zu ziehen, daß die verwendeten Pferdehämoglobininlösungen eine unterschiedliche Fermentwirkung aufweisen könnten, daher ist eine genaue Bestimmung der jeweiligen Peroxydaseaktivität der verwendeten Pferdehämoglobininlösung angezeigt.

Van Royen (9) hat festgestellt, daß die Peroxydasewirksamkeit des Hämoglobin-Haptoglobinkomplexes mit steigender Jodkonzentration im Reaktionsgemisch sinkt. Allerdings spielen dabei die bei den üblichen Haptoglobulinbestimmungsmethoden freiwerdenden Jodmengen keine Rolle als Fehlerquelle.

Aufgabe der vorgelegten Arbeit war es, die oben erwähnten Angaben von Jayle und Boussier einer haptoglobinspiegelsenkenden Wirkung der Glucocorticoide durch quantitative Serumhaptoglobinspiegelbestimmungen beim Gesunden zu überprüfen. Es wurde hierzu ein Dexamethasonderivat in einer Dosis angewandt, die um die Cushingschwelldosis liegt, und damit als chronische Gabe beim Kranken in Betracht kommt.

EIGENE VERSUCHE

A. Methodiken

a. Methodik der qualitativen Haptoglobinbestimmung

Diese wurde nach Smithies (37, 38) in der von Baitsch und Liebrich (39) beschriebenen Modifikation durchgeführt. Der Nachweis gelingt mit der Stärkegel-Elektrophorese, wobei der Hämoglobin-Haptoglobinkomplex und nicht gebundenes Hämoglobin durch Benzidin gefärbt und dadurch verschiedene, den einzelnen Typen entsprechende Bande sichtbar werden.

Reagentien und Lösungen:

a) Hydrolysierte Stärke nach Smithies (Starch hydrolysed der Connaugh Medical Laboratories, Toronto).

b) Borsäurepufferlösung für das Stärkegel in gering unterschiedlicher Zusammensetzung jeweils für die einzelnen Chargen der hydrolysierten Stärke (auf den Packungen angegeben), z.B. für Lot 130: 0,22 M Borsäure, 0,088 NaOH/l Aqua dest. (Kontinuierliches Borsäurepuffersystem pH 8,4 nach Smithies). Molekulargewicht der Borsäure ist 61,848, der NaOH 39,999. Borsäure ist in heißem Aqua dest. gut löslich.

c) Hämoglobinlösung: Mehrmaliges Waschen des Sedimentes von menschlichem Citratblut mit physiologischer NaCl-Lösung, Hämolysieren mit Aqua dest. (1 Vol. Erythrozyten mit 1 Vol. Aqua dest.), über Nacht stehen lassen, Abheben des Überstandes.

d) Borsäurepufferlösung für Elektroden-Brückenpuffer: 0,220 M Borsäure, 0,044 M NaOH/l. Die Brückentröge des Pherographen Original Frankfurt (g) werden mit je 700 ml Puffer gefüllt.

e) Benzidinlösung zum Färben der Gelstreifen: 1 Benzidintablette "Merck" (Benzidin 0,05 Barimperoxadat 0,20) in 7 - 10 ml 5% Essigsäure.

Apparative Ausrüstung:

f) PVC-Platten mit je 10 eingefrästen 28 cm langen, 1 cm breiten und 0,8 cm tiefen Kanälen (Herstellung Elektrophysikalisches Institut der Technischen Hochschule München).

g) Pherograph Original Frankfurt (L. Hormuth, Laborapparate, Wiesloch/Baden). Die Brückentröge werden auf die Kühlfläche aufgestellt. Anodisch und kathodisch wird je ein Brückentrog mit Platinbadelektrode und Borsäurepufferlösung (d) verwendet.

h) Filterkartonplättchen Schleicher & Schüll 5703,7 x 9 mm (Sonderanfertigung).

i) Filterpapier in Breite der Brückentröge zur Herstellung des elektrischen Kontaktes zwischen Stärkegel und Pufferlösung.

k) Stromspeisegerät.

Herstellung des Stärkegels:

Aufschwimmen der Stärke (a) in Borsäurepufferlösung (b), dabei Mengenverhältnis je nach der Charge der Stärke etwas unterschiedlich (auf den Packungen angegeben), z.B. für Lot 130: 13,5 g Stärke/100 ml Gelpuffer (b). Kochen in Erlenmeyerkolben über offener Flamme unter Schütteln. Bei Festwerden der Masse weiterkochen, bis der Stärkebrei wieder dünnflüssig wird. Absaugen der etwaigen Luftblasen mit Wasserstrahlpumpe (bei auf dem Kolben aufgesetztem durchbohrtem Gummistopfen). Ausgießen der Masse in die in PVC-Platten eingefrästen Kanäle (f). Abdecken der Tröge. Das Gel ist nach 1 - 2 Stunden gebrauchsfertig. Für einen Trog mit 10 Kanälen (f) sind 40,5 g Stärke (Lot 130 der Connaugh-Stärke und 300 ml Puffer (b) erforderlich.

Hämolysieren der Serumproben:

Absättigen des gesamten Haptoglobins mit Hämoglobin durch Zugabe von Hämoglobin im Überschuß (ca. 300 mg Hämoglobinlösung/100 ml Serum) durch Eintropfen der Hämoglobinlösung (c) in das Serum, schütteln, 30 Minuten bei Zimmertemperatur oder 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank stehen lassen.

Einbringen der künstlich hämolysierten Serumproben in das Gel:

In die in den Trögen befindlichen Gelstreifen werden mit einem Metallspatel Querschlitzte vorgestochen (4 Schlitzte pro Gelstreifen im Abstand von 5 cm). Tränken der Filterkartonblättchen (h). Ein Blättchen saugt 0,03 bis 0,04 ml hämolysiertes Serum auf. Einbringen der getränkten Filterkartonblättchen in die präformierten Schlitzte.

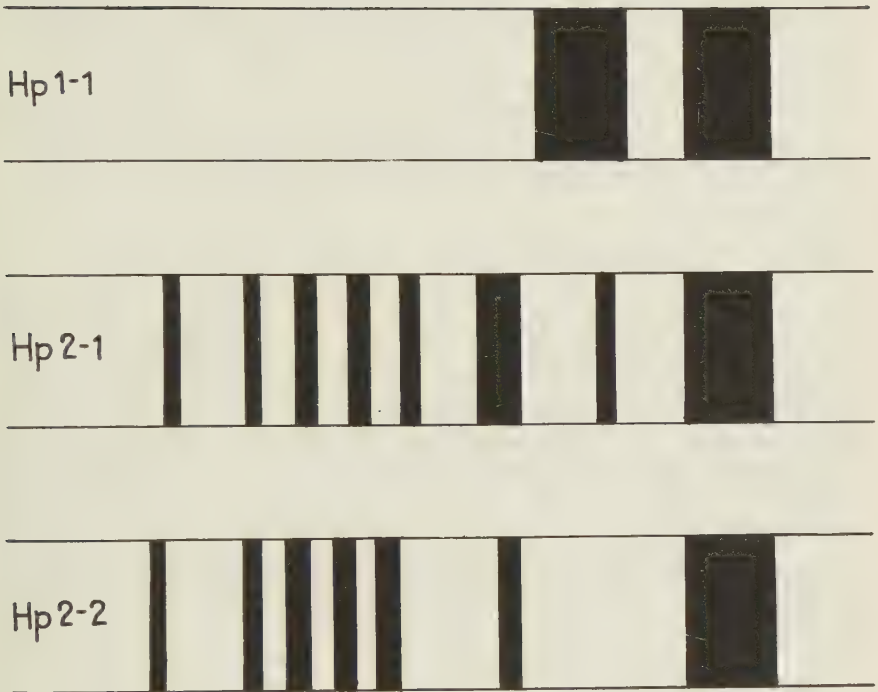


Abbildung II

Durchführen der Elektrophorese:

Aufsetzen der PVC-Tröge (f) mit Gelstreifen und serumgetränkten Filterkartonblättchen auf die Kanten der Brückentröge. Einbringen von 700 ml Borsäurepuffer (d) in die Brückentröge. Herstellen der elektrischen Verbindung zwischen Pufferlösung und Stärkegel mittels 5 Lagen Filterpapier (i). Anlegen einer Klemmenspannung von zunächst 650 Volt (Spannungsabfall im Gel: 13,5 V/cm, Stromdurchgang: 7,5 mA pro Gelkanal) für 20 Minuten, dann Reduktion auf 450 V (Spannungsabfall im Gel: 10 V/cm, Stromdurchgang: 6 mA pro Gelkanal). Gesamtdauer der Elektrophorese 1 bis 1 1/2 Stunden.

Entnehmen, Schneiden und Färben der Gelstreifen:

Nach der Beendigung der Elektrophorese werden die Gelstreifen mit speziell angefertigten 4 mm dicken und etwa 0,8 mm breiten Schiebern durch Unterschieben um die Hälfte ihrer Dicke herausgehoben und anschließend mit einem dünnen Draht der Länge nach aufgeschnitten. Abheben der oberen Hälfte und Färben der Schnittflächen durch Bepinseln mit Benzidinlösung (e). Die Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe färben sich in wenigen Sekunden.

Auswertung:

Die einzelnen Haptoglobintypen sind durch unterschiedliche Banden charakterisiert, wie sie in Abbildung I dargestellt sind. Seltene (modifizierte Typen sind hierbei nicht berücksichtigt).

b. Methodik der quantitativen Haptoglobinbestimmung

Die quantitative Haptoglobinbestimmung wurde nach der Aktivierungsmethode von Jayle, von uns gering modifiziert durchgeführt. Sie beruht auf dem Prinzip der Fähigkeit des Haptoglobins, stöchiometrisch mit Hämoglobin zu reagieren und dabei die Peroxydaseaktivität des Hämoglobins beträchtlich zu steigern. Durch Messung der Peroxydaseaktivität kann die Menge des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes bestimmt werden. Es wird so vorgegangen, daß nach Sättigung des Haptoglobins in einer bestimmten Serummenge mit Pferde-Hämoglobin Äthylhydroperoxyd zugegeben wird, das durch den entstandenen Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex in Sauerstoff und Äthylalkohol gespalten wird. Nach Aufnahme zweier Elektronen von zwei Jodionen aus einer zugegebenen Jodlösung durch das freigesetzte Sauerstoffatom entsteht

durch Oxydation elementares Jod, das mit Natriumthiosulfat titriert wird. Als Indikator dient Stärke. Die hierdurch ermittelte frei gewordene Jodmenge ist direkt proportional der Menge des die Reaktion katalysierenden Komplexes. Die zur Titration benötigte Menge Natriumthiosulfat ist also ein Maß für den Haptoglobingehalt des titrierten Serums.

Reagentien und Lösungen:

- a) Pferdehämoglobinlösung: 0,085 g Pferdehämoglobin (Schering) wird in 100 ml Aqua dest. gelöst. Aufbewahrung der Lösung im Kühlschrank ist etwa eine Woche lang möglich.
- b) Kaliumjodidlösung: 0,1 molare Kaliumjodidlösung (16,6 g Kaliumjodid pro 1 Aqua dest.). Aufbewahrung in dunkler Flasche.
- c) Acetatpufferlösung: pH 4,4 0,1 normal: 35 ml 0,1 n Essigsäure + 365 ml 0,1 n Natriumacetatlösung.
- d) Äthylhydroperoxydlösung 0,11 normal: Herstellung aus konzentrierter Lösung (AB Ferrosan, Malmö). Wiederholte Bestimmung der Normalität der konzentrierten Lösung ist erforderlich und geschieht folgendermaßen: 0,1 ml Äthylhydroperoxyd + 2 ml Kaliumjodidlösung (20 g/100 ml) + 2 Tropfen Essigsäure läßt man 4 Stunden in einer Porzellanschale stehen. Dann wird mit 0,05 n Natriumthiosulfatlösung titriert. Die aus der konzentrierten Lösung hergestellte 0,11 n Verdünnung kann im Kühlschrank etwa 2 Tage aufgehoben werden.
- e) Jodlösung: Die 1 n Stammlösung (in dunkler Flasche aufbewahren) wird vor Gebrauch auf 0,01 Normalität verdünnt. Die unverdünnte Lösung hält sich im Dunkeln bei $+4^{\circ}\text{C}$ etwa 2 - 3 Tage.
- f) Natriumthiosulfatlösung 0,01 n: Eine 0,1 n Stammlösung (in dunkler Flasche aufbewahren) wird vor Gebrauch auf 0,01 n verdünnt.
- g) Stärkelösung 0,5%ig als Indikator: 0,5 g Stärke auf 100 ml Aqua dest. Kurzes Kochen und kräftiges Schütteln der Lösung. Aufbewahren im Kühlschrank.

Apparative Ausrüstung:

- h) Wasserbad mit Thermostat (Köttermann). Darin PVC-Einsatz (Sonderanfertigung) mit halben Eiereinkaufsbehältern aus durchsichtigem Material. Wassertemperatur 32°C .

i) Automatische Bürette für 10 ml auf schwenkbarem Stativ (Sonderanfertigung).

Durchführung der Bestimmung:

Die im Wasserbad liegenden Schälchen (h) werden mit 0,1 ml der Pferdehämoglobinlösung (a) beschickt. Dazu kommt in 4 der Schälchen 0,02 ml der zu untersuchenden hämolysefreien Seren. Das erste Schälchen bleibt zur Bestimmung des Leerwertes von Hämoglobin ohne Serum. Wird das Serum nach der Gewinnung nicht gleich zum Versuch benutzt, kann es in eingefrorenem Zustand mehrere Wochen aufbewahrt werden. Es wird dann kurz vor der Bestimmung aufgetaut.

In jedes der 5 Schälchen werden dann 3 ml einer 32° warmen 0,1 normalen Kaliumjodidlösung (b) gegeben.

In 5 Reagenzgläsern hat man sich vor Beginn des Versuches ein Gemisch aus 10 ml Acetatpuffer pH 4,4 (c) und 1 ml Äthylhydroperoxydlösung (d) hergestellt. Nun wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt und im selben Moment der Inhalt des ersten Reagenzgläschens in das erste Schälchen gegossen. Wenn die Stoppuhr 40 Sekunden zeigt, fügt man dem ersten Schälchen 0,5 ml Jodlösung zu (e). Wenn die Stoppuhr bei 60 Sekunden ist (also eine Minute nach Beschickung des ersten Becherglases), wird das zweite Reagenzglas in das zweite Becherglas gegossen, nach wiederum 40 Sekunden 0,5 ml Jodlösung (e) zugefügt und so weiter, bis alle 5 Behälter eine Mischung aus Äthylhydroperoxydlösung, Acetatpuffer, Kaliumjodid, Jodlösung, Pferdehämoglobin und Serum enthalten, bis auf das erste Schälchen, das kein Serum enthält.

15 Sekunden, nachdem das letzte der 5 Schälchen mit dem Acetatpuffer-Äthylhydroperoxydgemisch beschickt ist, werden zum ersten Schälchen 3 Tropfen Stärkelösung (g) zugefügt, und nach weiteren 15 Sekunden mit der Titration begonnen.

Die Titration muß nach 30 Sekunden beendet sein, wenn der Zeiger der Stoppuhr also wieder auf 0 steht. 15 Sekunden später wird zum zweiten Schälchen Stärkelösung (g) hinzugefügt und wiederum 15 Sekunden später auch das zweite Schälchen mit Natriumthiosulfat (f) titriert. Auf diese Weise werden alle Proben titriert und die jeweils verbrauchte Natriumthiosulfatmenge abgelesen.

Die Titration des ersten Schälchens beginnt genau 4 Minuten 30 Sekunden nachdem es mit dem Äthylhydroperoxyd-Acetatpuffergemisch beschickt wurde, die sich abspielenden Reaktionen hatten also 4 Minuten 30 Sekunden Zeit. Die Titration selbst dauert jeweils 30 Sekunden. Auf diese Weise ist eine Reihe mit 5 Schälchen nach 9 Minuten insgesamt titriert.

Vom Leerwert und von jedem Serum wurden jeweils Doppelversuche durchgeführt, und bei Schwankungen über 0,05 ml in der verbrauchten Natriumthiosulfatmenge wurde der Versuch wiederholt. Ansonsten wurde der Mittelwert der Auswertung zu Grunde gelegt.

Auswertung:

Aus dem Titrationswert ist der Haptoglobin-Index zu errechnen, der durch die Menge 0,01 n Jodlösung in ml definiert ist, die durch Einwirkung von 0,05 ml Serum in 5 Minuten frei wird. Da wir bei unserer Versuchsanordnung mit 0,02 ml Serum statt 0,05 ml Serum arbeiteten, war der Titrationswert mit dem Faktor 2,5 zu multiplizieren. Dadurch erhält man den Haptoglobin-Index. Aus diesem ist wiederum der absolute Haptoglobingehalt in mg/100 ml Serum unter Berücksichtigung der Molekulargewichte des Haptoglobins und des Hämoglobins durch Multiplikation mit dem Faktor 106,25 zu errechnen.

B. Angewandte Versuchssubstanz

Als Versuchspräparat wurde St 135 (Merck) verwendet, ein 9- α -Fluor-16-Methylenprednisolon.

St 135 wurde als Analogon zu Dexymethason (16- α -Methyl-9- α -Fluor-prednisolon) entwickelt, dem bislang quantitativ wirksamsten Präparat der eingeführten Glucocorticoidderivate. 9- α -Fluor-16-Methylenprednisolon hat eine sehr viel geringere Mineralaktivität und eine stärkere Hemmung des Hypophasen-Nebennierenrindensystems, als die Basissteroido Cortison und Cortisol. Außerdem unterscheidet es sich durch eine etwas stärkere Ausschwemmung von Calcium und Phosphor und eine Negativierungstendenz der Stickstoffbilanz von den physiologischen Ausgangssubstanzen.

Tilling (33) prüfte St 135 klinisch und tierexperimentell. Im Eosinophilentest beim Menschen lag der Grenzwert zur Erzielung einer 50%igen Zellverminderung bei 0,75 mg St 135/die. Der depressorische Einfluß auf das

Eosinophilensystem klingt nach 8 - 10 Stunden ab:

Nebenwirkungen auf Blutdruck, Gewicht, Appetit und Allgemeinbefinden wurden nicht gefunden. Magenbeschwerden traten auch bei Ulcuspatienten, die 10 Tage lang mit 3 mg/die belastet wurden, nicht in Erscheinung. Ebenso wenig war eine Blutdrucksteigerung bei Hypertonikern zu finden. Kalium- und Natriumspiegel schwankte lediglich im Normbereich.

Als einzig auffällige Nebenwirkung zeigt sich eine Neigung zu Steroiddiabetes, der aber nach Absetzen des Präparates wieder verschwand. Die niedrigste Tagesdosis für das Auftreten eines Spontandiabetes lag bei 6 mg/die für 6 Tage lang. Bei Gaben von höheren Dosen war auch die Zuckerausscheidung ziemlich hoch.

C. Versuchsreihen

Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt.

Versuchsreihe 1:

10 gesunde Versuchspersonen bekamen 1,5 mg St 135/die über 14 Tage lang.

Vorher wurden die normalen Haptoglobinwerte der jeweiligen Versuchsperson bestimmt, indem jeweils eine Blutentnahme am 1., 3., 5. und 7. Tag der Versuchszeit vorgenommen wurde, ohne daß vorher irgend ein Präparat eingenommen wurde. Dann bekamen alle Versuchspersonen 1,5 mg St 135/die über 7 Tage lang. Danach wurde eine Haptoglobinbestimmung durchgeführt. Die selbe Dosis St 135 wurde über weitere 7 Tage eingenommen und eine abschließende Haptoglobinbestimmung nach nun insgesamt 14 Tagen St 135 1,5 mg/die durchgeführt.

Versuchsreihe 2:

Bei 5 Patienten, die sich einer Operation unterziehen mußten, wurde der Haptoglobinspiegel vor der Operation bestimmt. Eine weitere Bestimmung wurde 2 Tage nach der Operation durchgeführt. Dann bekamen diese 5 Patienten ebenfalls 1,5 mg St 135/die über 14 Tage lang.

Es wurde dann wie bei Versuchsreihe 1 nach achttägiger Medikation der Haptoglobinwert bestimmt und ein weiteres Mal nach 14tägiger Medikation.

Versuchsreihe 3:

Bei 5 Operation zugeführten Patienten wurde der Haptoglobinwert ebenfalls vor und 2 Tage nach Operation bestimmt. Sie bekamen aber kein

St 135, sondern es wurde nach weiteren 7 und dann 14 Tagen der Haptoglobinwert ohne Medikation bestimmt, um zu sehen, wie schnell sich die durch die Operation angestiegenen Haptoglobine ohne eventuell mögliche Beeinflussung durch St 135 normalisierten.

D. Versuchsergebnisse

Die Versuchsergebnisse sind aufgegliedert in die Tabelle I = Versuchsreihe 1, Tabelle II = Versuchsreihe 2, Tabelle III = Versuchsreihe 3.

TABELLE 1

	Leer- wert	Leer- wert	Leer- wert	Leer- wert	nach 7 Tagen St 135	nach 14 Tagen St 135
H.W. männl. 2-1						
Titrationwert	0,25	0,26	0,20	0,28	0,36	0,28
Hapt. -Index	0,63	0,65	0,50	0,70	0,90	0,70
Hapt. Menge mg%	66,98	68,97	53,13	74,38	95,63	74,38
Abweichung in %					+45,24	+12,97
M.H. weibl. 2-2						
Titrationwert	0,20	0,18	0,19	0,21	0,35	0,16
Hapt. -Index	0,50	0,45	0,48	0,59	0,83	0,40
Hapt. Menge mg%	53,13	47,81	51,00	62,69	88,18	42,50
Abweichung in %					+64,36	-20,78
G.K. männl. 2-2						
Titrationwert	0,16	0,04	0,06	0,09	0,18	0,14
Hapt. -Index	0,40	0,10	0,15	0,23	0,45	0,35
Hapt. Menge mg%	42,50	10,63	15,94	24,48	47,81	37,19
Abweichung in %					+104,48	+59,06
M.F. weibl. 2-1						
Titrationwert	0,26	0,18	0,18	0,15	0,08	0,21
Hapt. -Index	0,65	0,45	0,45	0,38	0,20	0,53
Hapt. Menge mg%	68,97	47,81	47,81	40,38	21,25	56,31
Abweichung in %					-58,52	+9,89
A.K. weibl. 2-1						
Titrationwert	0,29	0,29	0,24	0,18	0,32	0,25
Hapt. -Index	0,73	0,73	0,62	0,45	0,80	0,68
Hapt. Menge mg%	77,56	77,56	65,88	47,81	85,00	72,25
Abweichung					+36,65	+16,15
H.M. männl. 1-1						
Titrationwert	0,44	0,36	0,42	0,32	0,36	0,49
Hapt. -Index	1,10	0,90	1,05	0,80	0,90	1,23
Hapt. Menge mg%	116,88	95,63	111,56	85,00	95,63	130,69
Abweichung in %					-6,48	+2,78

	Leer- wert	Leer- wert	Leer- wert	Leer- wert	nach 7 Tagen St 135	nach 14 Tagen St 135
H.H. weibl. 2-1						
Titrationwert	0,29	0,33	0,27	0,20	0,28	0,27
Hapt. -Index	0,73	0,83	0,68	0,50	0,70	0,68
Hapt. Menge mg%	77,56	88,18	72,25	53,13	74,38	72,25
Abweichung in %					+2,08	-0,72
V.S. weibl. 2-2						
Titrationwert	0,32	0,39	0,37	0,40	0,34	0,32
Hapt. -Index	0,80	0,97	0,93	1,00	0,85	0,80
Hapt. Menge mg%	85,00	103,06	98,81	106,25	90,31	85,00
Abweichung in %					-8,10	-13,56
O.K. weibl. 2-2						
Titrationwert	0,09	0,08	0,08	0,07	0,14	0,06
Hapt. -Index	0,23	0,20	0,20	0,18	0,35	0,15
Hapt. Menge mg%	24,48	21,25	21,25	19,13	37,19	15,94
Abweichung in %					+72,89	-25,93
M.S. weibl. 2-1						
Titrationwert	0,14	0,12	0,16	0,16	0,15	0,28
Hapt. -Index	0,35	0,30	0,40	0,40	0,38	0,70
Hapt. Menge mg%	37,19	31,88	42,50	42,50	40,38	74,38
					+4,87	+93,15

TABELLE 2

	vor Op.	2 Tage nach Op.	nach 7 Tagen St 135	nach 14 Tagen St 135
F. L. weibl. 2-1				
Op. einer Pseudoarthrose				
Titrationwert	0,21	0,21	0,07	0,09
Hapt. -Index	0,55	0,55	0,18	0,23
Hapt. Menge mg%	58,44	58,44	19,13	24,44
Abweichung in %		+0	-67,26	-58,17
L. K. weibl. 2-2				
Op. einer Hüftluxation				
Titrationwert	0,07	0,21	0,14	0,09
Hapt. -Index	0,18	0,53	0,35	0,23
Hapt. Menge mg%	19,13	56,31	37,88	24,44
Abweichung in %		+194,34	+98,01	+27,76
H. J. männl. 2-1				
Op. von Klumpfüßen bds.				
Titrationwert	0,37	0,48	0,40	0,38
Hapt. -Index	0,93	1,20	1,00	0,95
Hapt. Menge mg%	98,81	127,50	106,25	100,94
Abweichung in %		+29,03	+7,52	+2,15
J. H. männl. 1-1				
Op. eines Innenmeniskusrisses				
Titrationwert	0,35	0,58	0,46	0,38
Hapt. -Index	0,88	1,45	1,15	0,95
Hapt. Menge mg%	93,50	154,06	122,19	100,94
Abweichung in %		+64,77	+30,68	+7,94
A. T. männl. 1-1				
Op. einer Hüftluxation				
Titrationwert	0,41	0,65	0,54	0,45
Hapt. -Index	1,03	1,62	1,35	1,17
Hapt. Menge mg%	109,44	172,30	143,44	124,31
Abweichung in %		+57,40	+31,07	+13,58

TABELLE 3

	vor	2 Tage nach	9 Tage nach	16 Tage nach
	Op.	Op.	Op.	Op.
A.L. weibl. 2-1				
Op. eines Magencarcinoms				
Titrationwert	0,71	0,84	0,82	0,76
Hapt. -Index	1,78	2,10	2,05	1,90
Hapt. Menge mg%	189,13	223,13	217,81	201,88
Abweichung in %		+17,97	+15,16	+6,74
H.Z. weibl. 2-2				
Op. einer Steingalle				
Titrationwert	0,14	0,23	0,21	0,14
Hapt. -Index	0,35	0,58	0,53	0,35
Hapt. Menge mg%	37,88	61,63	56,31	37,88
Abweichung in %		+62,69	+48,65	<u>+0</u>
K.L. weibl. 2-1				
Op. einer Magenstenose				
Titrationwert	0,17	0,38	0,32	0,31
Hapt. -Index	0,43	0,95	0,80	0,78
Hapt. Menge mg%	45,69	100,94	85,00	82,88
Abweichung in %		+120,92	+86,04	+81,39
A.R. weibl. 2-2				
Op. einer Appendecitis				
Titrationwert	0,19	0,29	0,24	0,18
Hapt. -Index	0,48	0,73	0,60	0,45
Hapt. Menge mg%	51,00	77,56	63,75	47,81
Abweichung in %		+52,08	+25,00	-6,25
A.B. weibl. 2-2				
Op. eines Magenpolypen				
Titrationwert	0,34	0,44	0,40	0,38
Hapt. -Index	0,85	1,10	1,00	0,85
Hapt. Menge mg%	90,31	116,88	106,25	90,31
Abweichung in %		+29,42	+17,65	<u>+0</u>

DISKUSSION

Der Auswertung wurden die von Mathies, Schleifer und Liebrich (35) aus 299 Seren von Blutspendern aus dem oberbayerischen Raum ermittelten Normwerte zu Grunde gelegt. In Abbildung I sind die Normwerte und statistisch berechneten Toleranzbereiche für die einzelnen Typen getrennt nach Männern und Frauen angegeben.

Unsere Versuchsergebnisse zeigen unter Zugrundelegung dieser gefundenen Normwerte, daß von den 20 Versuchspersonen 10 außerhalb des 70%-Toleranzbereiches lagen. Der Erwartungswert außerhalb dieses Toleranzbereiches beträgt 30 %, wobei jedoch bei der geringen Zahl von 20 Versuchspersonen eine 90%-Vertrauensgrenze von 11,89 % - 54,28 % anzusetzen ist, die somit nicht überschritten wird. Bei Betrachtung des 95%-Toleranzbereiches liegen die Werte einer Versuchsperson, abgesehen von einer weiteren Versuchsperson mit ausgedehntem Magencarcinom, außerhalb dieses Toleranzbereiches. Dieses Ergebnis entspricht dem Erwartungswert. Bei der genannten Versuchsperson mit Magencarcinom erscheint eine Abweichung vom Normwert nicht verwunderlich. Bei dieser Patientin lagen die Haptoglobinspiegelwerte oberhalb des 98%-Toleranzbereiches. Dieses Ergebnis bestätigt die Angabe von Jayle und Boussier (13), nach der bei carcinomatösen Erkrankungen, besonders wenn bindegewebliche Elemente durch den Primärtumor oder durch Metastasen beteiligt sind, erhöhte Haptoglobinwerte gefunden werden. Nach Nyman (17) und Polonovski (36) sollen allerdings Haptoglobinspiegelerhöhungen nur auftreten, wenn Metastasen im Skelettsystem oder in der Lunge zu finden sind, während bei lokalisiertem Carcinom die Haptoglobininwerte normal sein sollen. Die mehrfachen Leerbestimmungen ergaben in manchen Fällen nicht unerhebliche Schwankungen. Die durchgeführten Doppelbestimmungen zeigten, daß die Schwankungsbreite der Methodik gering ist und unter einer Abweichung des Titrationswertes von 0,05 liegt. Diese Schwankungsbreite wird bei Durchführung mehrerer Bestimmungen im Zwischenraum von 2 - 3 Tagen in fast allen Fällen deutlich übertroffen. Damit ist der Haptoglobinspiegel des einzelnen Individuums nicht immer unbedingt konstant, wie dies von Nyman (17) angegeben wird. Dennoch sind im allgemeinen die Abweichungen nicht erheblich und liegen im Mittel bei einer Differenz des Titrationswertes von 0,08 und schwanken zwischen maximal 1,12 und 0,02.

Diese bei der Ermittlung mehrerer Leerwerte gefundene Differenz dient zum Vergleich der Beeinflussung des Haptoglobinspiegels durch die Medikation mit

9- α -Fluor-16-Methylenprednisolon, bzw. durch Operationen. Bei Betrachtung der Mittelwerte fällt eine Steigerung der Haptoglobinmenge in mg% durch St 135 Medikation auf, die nach 7 Tagen Applikation +25,74% erreicht und trotz Fortdauer der Medikation nach 14 Tagen auf 13,30% herunterging. Dieser Berechnung wurde der mittlere Leerwert, ermittelt aus den 4 Leerbestimmungen jeder Versuchsperson zu Grunde gelegt. Dieses Vorgehen erscheint jedoch nicht unbedingt erlaubt, da man viel mehr die Differenz der Werte jeder einzelnen Versuchsperson zwischen dem Haptoglobin-Index während der Medikation und dem möglichen Schwankungsbereich der Leerwerte zu Grunde legen sollte. Bei dieser Art der Berechnung fällt auf, daß in den meisten Fällen die Abweichung nicht erheblich ist. In 5 von 10 Fällen war eine meist nur geringe Steigerung des Haptoglobin-Index von maximal 0,24 und minimal 0,05 (im Mittel 0,14) festzustellen. 4 Fälle lagen auch nach 7tägiger St 135 Medikation innerhalb der Schwankungsbreite der Leerwerte und 1 Fall zeigte ein Absinken des Haptoglobin-Index von 0,25. In Anbetracht der möglichen Schwankungen innerhalb der einzelnen Leerwerte erscheint damit die mittlere Steigerung des Haptoglobinspiegels durch St 135 Medikation nicht erheblich, wenn man sie auch konstatieren muß.

In 2 von den Fällen, die nach 7tägiger St 135 Medikation noch im Bereich der Schwankungsbreite der Leerwerte lagen, wurde nach 14tägiger Medikation noch ein Anstieg über die individuelle Schwankungsbreite von 0,3 bzw. 0,13 vermerkt. Auch diese Differenzen erscheinen jedoch nicht erheblich. Ein Fall, der nach 7tägiger Medikation eine Steigerung erkennen ließ, fiel mit seinem Haptoglobin-Index nach 14tägiger Medikation unter seinen Schwankungsbereich ab. Die Differenz betrug -0,03. In keinem Falle verließen die Werte während St 135 Belastung den 90%-Toleranzbereich. Die Versuchsergebnisse bestätigen damit nicht die Annahme eines Haptoglobinspiegelabfalls durch Glucocorticoideinfluß, zumindest nicht bei Verwendung von Dosen, die an der Grenze bzw. unterhalb der Cushing-schwellldosis liegen. Es war im Mittel eher eine leichte Steigerung festzustellen, die jedoch sicher nicht signifikant ist.

Unsere Untersuchungen der Versuchsreihe 2 und 3, bei denen jeweils allerdings nur ein Leerwert bestimmt wurde, zeigen bis auf einen Fall einen Anstieg des Haptoglobinspiegels 2 Tage nach Operation aus unterschiedlicher Indikation und bei verschiedener Schwere des operativen Eingriffes. Im Mittel betrug die Steigerung 61,85%, maximal +194,34% und minimal $\pm 0\%$.

Bei dem letztgenannten Fall handelt es sich um den bereits erwähnten Patienten ohne Beeinflussung des Haptoglobinspiegels durch die Operation. Wenn man die in der Versuchsreihe 1 beobachtete Schwankungsbreite der Leerwerte betrachtet, erscheinen diese Steigerungen jedoch auch nicht erheblich. Die Konstanz des Befundes bei allen Patienten bis auf den einen Fall ohne Beeinflussung des Haptoglobinspiegels läßt jedoch an einer Erhöhung des Haptoglobinsatzes durch operative Eingriffe nicht zweifeln. Damit werden die von Schumacher und Schlumberger (24) mitgeteilten Ergebnisse insgesamt bestätigt. Mit Ausnahme eines einzigen Falles mit einem Ausgangswert außerhalb der 90%-Toleranzgrenze und der Patientin mit Magencarcinom wurde eine Unter- oder Überschreitung der 90%-Toleranzgrenze durch die Belastung der Operation nicht hervorgerufen.

Die Erhöhung des Haptoglobinspiegels ging, wie Versuchsreihe 3 zeigt, 9 Tage nach der Operation bereits wieder zurück, erreichte jedoch bei allen 5 Patienten noch nicht wieder den Ausgangswert. Dieser wurde 14 Tage nach Operation nur von 2 Versuchspersonen wieder erreicht, wenn man eine Indextdifferenz von 0,01 als nicht existent betrachtet.

Die Versuchsreihe 2 zeigt, daß die durch die Operation hervorgerufene Steigerung des Haptoglobinspiegels durch eine St 135 Applikation rascher zurückzugehen scheint, wie eine Berechnung der Differenzwerte im Vergleich zum Wert 2 Tage nach Operation zeigt. In einem Falle wurden durch St 135 Medikation sogar Werte erreicht, die unterhalb des vor der Operation ermittelten Index liegen.

Wenn man die in allen Versuchsreihen gefundenen Verhältnisse zusammenfaßt, so scheint es, daß die Glucocorticoidmedikation in der von uns gewählten Dosierung bei gesunden Versuchspersonen keine Senkung des Haptoglobinspiegels, sondern eher eine mehr oder weniger unerhebliche Steigerung verursacht. Dagegen wird eine aus anderen Gründen (in diesem Falle operative Eingriffe) verursachte Steigerung des Haptoglobinspiegels durch die Glucocorticoidmedikation in reduzierendem Sinne beeinflußt, wenn auch dieser Effekt sich nur in mäßigen Grenzen hält.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Einfluß eines Dexamethasonderivates auf den Haptoglobinspiegel von Normalpersonen und von durch Operation belasteten Patienten untersucht. Die Steroidmedikation in Cushingschwelldosen hatte keinen Haptoglobinspiegel senkenden Effekt, sondern bewirkte eher eine geringe, jedoch nicht ins Gewicht fallende Steigerung der Werte. Operationen bewirkten eine deutliche, wenn auch nicht erhebliche Steigerung des Haptoglobinspiegels, der durch die Steroidmedikation sich rascher seinem Ausgangswert näherte.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Polonovski, M. und M.F. Jayle:
Peroxydases animales. Bull. Soc. Chim.
biol (Paris) 20, 978 (1938)
2. Jayle, M.F. und J. Badin: Constitution chimique et électrophorèse de
l'Haptoglobine. C.R. Soc. Biol. (Paris) 114,
1475 (1950)
3. Guinand, S., J. Tonnelat, G. Boussier et M.F. Jayle:
Propriétés physiques de l'haptoglobine,
séromucoïde α_2 et de sa combinaison
hémoglobinique. Bull. Soc. Chim. bio.
(Paris) 38, 329 (1956)
4. Jayle, M.F. et P. Gillard: Précipitation saline d'une protéine définie
dans un mélange hétérogène. Bull. Soc. Chim.
biol. (Paris) 29, 149 (1947)
5. Smithies, O. and N.F. Walker:
Genetical control of some serum proteins in
normal human serum. Nature 176, 1265
(1955)
6. Allison, A.C.:
Genetic control of human haptoglobin syn-
thesis. Nature, London 183, 1312 (1959)
7. Jayle, M.F. et G. Boussier:
Obtention à l'état homogène d'une muco-
protéine sérique, l'haptoglobine. Bull. Soc.
Chim. biol. (Paris) 36, 959 (1954)
8. Schumacher, G. und H.D. Schlumberger:
Eigenschaften, Bestimmung und klinische Be-
deutung von Haptoglobin. Klin. Wschr. 40,
2 (1962)
9. Royen, A.H. van:
Het haptoglobine, een bijdrage tot de kennis
der α_2 -Globulinen. Diss. Delft 1950

10. Allison, A.C.: The genetical and clinical significance of the haptoglobins. Proc. Roy. Soc. Med. London 51, 639 (1958).
11. Allison, A.C. and W. Rees: The binding of hemoglobin by plasma proteins (haptoglobins). Brit. Med. J. 2, 1137 (1957)
12. Jayle, M.F. et G. Boussier: Islement à l'état pur de l'haptoglobine, mucoprotéine α_2 du sérum propriétés et intérêt clinique. Presse méd. 62, 1752 (1954)
13. Jayle, M.F. et G. Boussier: Les séromucoides du sang, leurs relations avec mucoprotéines de la substance fondamentale du tissu conjonctif. Expos. ann. Biochim. méd. 17, 157 (1955)
14. Jayle, M.F., J. Serpicelli et L. Robert: Etude polarographique des mucoides, sulfosalicylosolubles du sérum sanguin. Clin. chim. Acta 1, 452 (1956)
15. Jayle, M.F. et G. Boussier et H.J. Batias: Relation entre le toux de l'haptoglobine, celui des globulines α_2 et des mucopolysaccharides circulants en pathologie. C.R. Soc. Biol. 149, 46 (1955)
16. Jayle, M.F. and J. Moretti: Haptoglobin, Biochemical, Genetic and Physiopathologie Aspects. Progr. Hematology 3, 342 (1962)
17. Nyman, M.: Serum Haptoglobin. Methodological and Clinical Studies. Akademisk Avhandling, Lund 1959. Also published: Scand. J. Clin. Lab. Invest. Vol. II Suppl. 39 (1959)
18. Sonnet, J.: Les glucoprotéines sériques à l'état normal et pathologique. Diss. Brüssel 1956

19. Kluthe, R. und P. Meyer: Bestimmung des α_2 -Haptoglobinspiegels bei Nierenerkrankungen. Klin. Wschr. 39, 205 (1961)
20. Allison, A.C.: Diskussionsbemerkung. Proc. 8 the Congr. Europ. Soc. Haemat. 1961
21. Robert, L., P. Mombelloni and P. Crosti:
Studies on Serum Haptoglobin in Experimental Connective Tissue Disorders. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 107, 499 (1961)
22. Mathies, H. und M. Schattenkirchner:
in Vorbereitung
23. Allison, A.C., B.S. Blumberger and W. Rees:
Haptoglobin types in British, Spanish, Basque and Nigerian African Populations. Nature (London) 181, 824 (1958)
24. Schumacher, G. und H.D. Schlumberger:
Klinische und experimentelle Studien über Verhalten und Funktion der α_2 -Globuline. III. Mitt. Haptoglobinveränderungen bei posttraumatischer Entzündung. Klin. Wschr. 40, 81 (1962)
25. Allison, A.C.: Haptoglobins. Blut 5, 201 (1959)
26. Borglin, N.E. and M. Nyman:
Effect of estrogens on the haptoglobin level in the blood. Scand. J. clin. Lab. Invest. 13, 107 (1961)
27. Studnitz, W. v. and M. Nyman:
Effect of androgens on α_2 -globulins in women. J. clin. Endocr. 17, 910 (1957)
28. Jayle, M.F.: Evaluation moléculaire de l'haptoglobine par une réaction enzymatique de peroxydation. C.R. Acad. Sci. 211, 574 (1940)

29. Jayle, M.F.: Les modifications biochimiques et physicochimiques du plasma sanguin au cours de l'infection. Exp. ann. de Biochim. méd. 3, 162 (1942)
30. Jayle, M.F.: Méthode de dosage de l'haptoglobine sérique. Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 876 (1951)
31. Robert, L., V. Bajic et M.F. Jayle: Action de certains glycidés et polyélectrolytes sur la combinaison de l'hémoglobine avec l'haptoglobine sérique et sur son activité catalytique. C.R. Acad. Sci. 242, 2868 (1959)
32. Smithies, O.: Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins. Adv. in prot. chem. 14, 65 (1959)
33. Tilling, W.: Wirkungen neuentwickelter Corticosteroid-derivate. Ärztl. Forschung. Sonderdruck XIV, Jahrg. 11, I/557 - I/560 (1960)
34. Bajic, V.: Etude du mécanisme de formation du complexe hémoglobine-haptoglobine et de son activité catalytique. Diss. Paris 1958
35. Mathies, H., E. Schleifer und K.G. Liebrich: Haptoglobinspiegel-Untersuchungen bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. In Vorbereitung.
36. Polonovski, M.: L'haptoglobine et sa signification clinique. Recherches médicales en France pendant la guerre 1939 - 1945. Paris 1945. Zit. nach 17
37. Smithies, O.: Zone Electrophoresis in Starch Gels. Groupes Variations in the Serum Proteins of Normal Adults. Biochim. J. 61, 629 (1955)

38. Smithies, O.: Grouped Variations in the Occurrence of
New Proteins in Normal Human Serum.
Nature (London) 175, 307 (1955)
39. Baitsch, H. und K.G. Liebrich: Haptoglobintypen, Methodik ihrer Bestimmung,
Allelenhäufigkeit in einigen Stichproben. Blut VII, 27 und 69 (1961)

Herrn Professor Dr. W. Seitz möchte ich für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates danken.

Herrn Dr. H. Mathies danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Ratschläge während der Versuche und während der Abfassung der Arbeit.

Der med.-techn. Assistentin Fräulein V. Schüle sage ich meinen Dank für die hilfsbereite und tatkräftige Unterstützung.

Lebenslauf

Am 20. September 1933 wurde ich als erstes Kind des Kaufmanns Otto Staiger und seiner Frau Edith in Pforzheim geboren.

1939 kam ich in die erste Klasse der Volksschule in Stuttgart. Vorübergehend siedelten wir im Sommer 1944 nach Pforzheim um, wo ich bis Herbst 1944 die Volksschule besuchte, um nach bestandener Aufnahmeprüfung in die erste Klasse der Oberschule überzuwechseln. Nach einer Unterbrechung der Schulzeit durch die Kriegsverhältnisse wurde ich im Oktober 1945 in das Königin-Charlotte-Gymnasium in Stuttgart eingeschult. Dort bestand ich im Februar 1954 das Abitur.

Im Sommersemester 1955 begann ich mit dem Studium der Biologie in Tübingen, nachdem ich die Zeit nach dem Abitur bei der Firma Breuninger in Stuttgart gearbeitet hatte. Zum Sommersemester 1956 wechselte ich an die Universität Freiburg über und ließ mich dort im Wintersemester 1956/57 in die Medizinische Fakultät einschreiben. Die drei Semester Biologiestudium wurden mir als zusammen ein Semester auf das Studium der Medizin angerechnet. Im Sommer 1957 wechselte ich zur Universität Hamburg über und bestand dort im Juli 1958 das Physikum. Danach setzte ich mein Studium an der Universität Wien fort (Winter 1958 bis Sommer 1959). Nach München kam ich zum Beginn des Wintersemesters 1959. Am 19. Dezember 1961 bestand ich an der Universität München des medizinische Staatsexamen.

Am 1. Februar 1962 begann ich meine Medizinalassistentenzeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität München, wo ich bis 31. Mai blieb. Vom 1. Juni bis 30. Dezember 1962 war ich am Städtischen Krankenhaus München-Oberföhring auf der chirurgischen Abteilung und bin jetzt ab 1. Dezember an der Städtischen Kinderklinik Schwabing.

